

胆汁うっ滞時の胆管上皮細胞の再生についての動物モデルを用いた検討

著者	守時 由起
号	2361
発行年	2006
URL	http://hdl.handle.net/10097/22977

氏 名（本籍）
守^{もり} 時^{とき} 由^{ゆう} 起^き

学 位 の 種 類
博 士（医 学）

学 位 記 番 号
医 博 第 2 3 6 1 号

学位授与年月日
平 成 18 年 3 月 24 日

学位授与の条件
学位規則第 4 条第 1 項該当

研 究 科 専 攻
東北大学大学院医学系研究科
（博士課程）医科学専攻

学 位 論 文 題 目
胆汁うっ滞時の胆管上皮細胞の再生についての動物モデルを用いた検討

論文審査委員
(主 査)
教授 下瀬川 徹 教授 海 野 倫 明
教授 林 富

論文内容要旨

背景

肝内胆管消失は原発性胆汁性肝硬変のような難治性胆汁うっ滞性疾患において観察される。胆管細胞の低増殖性がある一因をなすと考えているが、その詳細は不明である。近年提唱されつつある幹細胞は魅力ある治療概念であるが、骨髄細胞 (bone marrow cells, BMCs) が胆汁うっ滞マウスモデルにおいて胆管細胞に分化しうるかは不明である。そのため、(研究1) として BMCs の胆管細胞への分化能を検討した。また、上皮細胞まで分化しながら未分化状態を保持している羊膜細胞は骨髄細胞よりも胆管上皮細胞への分化が容易である可能性を考え、(研究2) として羊膜細胞の胆管上皮細胞への分化を検討した。

方法

EGFP (Enhanced green fluorescent protein) -トランスジェニック C57BL/6NJcl マウス (EGFP マウス) を細胞源として用いた。(研究1) 正常 C57BL/6NJcl マウスに致死放射線照射 (800 rad) を施し、自身の骨髄増殖能を抑制した。このマウスに EGFP マウスから採取した BMCs を注入した。0.1% ANIT (α -naphthylisothiocyanate) 餌を与えることにより、胆汁うっ滞及び胆管増殖を起こした。胆管細胞および oval cells について、形態学および組織免疫染色 (CK-7, A6) により検討した。EGFP マウス由来の BMCs について共焦点レーザー顕微鏡で観察した。細胞増殖 (PCNA 蛋白), HGF レセプター発現 (c-Met), ならびに幹細胞レセプター発現 (c-kit) についても評価した。また、胎生期胆管の分化に関与する Notch2 と Hes1 についても観察した。(研究2) EGFP 妊娠マウスより羊膜を得た。EGFP 羊膜由来の単離細胞を注入し、(研究1) 同様にレシピエントに胆汁うっ滞を起こし、経時的に胆管細胞への分化能および周辺蛋白の発現を検討した。

結果

(研究1) EGFP マウス由来の BMCs 注入3週後には末梢血および骨髄に注入細胞の生着を見た。定量的 PCNA 染色により、ANIT 餌マウスでは著明な胆管増殖を認めた (2.0-4.2 倍 vs. コントロール)。この胆管増殖自体は照射の影響を受けなかった。しかし、注入後1-5週後までの観察期間で EGFP と CK7 両者共陽性の細胞は確認できなかった。さらに EGFP の免疫染色にても確認したが、陽性細胞は存在しなかった。肝実質には散在性に EGFP 陽性細胞を認めたが、いずれの細胞も CK-7 もしくは c-Met との共陽性を示さなかった。ANIT 餌中止後増殖胆管は経時的に消失した。一連の経過観察期間中 Notch2 もしくは Hes1 蛋白発現は増殖胆管で認めなかつ

た。(研究2) 注入した羊膜細胞は免疫染色にて CK-7 陰性, CD45 (Luekocyte Common Antigen) 陰性であった。羊膜細胞注入2週, 4週後の肝組織にてコントロール群である ANIT 非投与群では CK-7免疫染色にて有意な胆管増殖を認めず, PCNA 染色でも胆管上皮細胞のごく一部のみ陽性であった。一方 ANIT 投与群(胆汁うっ滞群)では CK-7免疫染色にて胆管増殖を認め, さらに PCNA 染色にて胆管上皮細胞の約30%において陽性であった。一部のマウスでは管腔構造を形成する胆管細胞の一部に EGFP, CK-7二重染色共陽性細胞を認めた。

結 論

ANIT 餌投与により顕著な胆管増殖を認めた。PCNA 陽性細胞の増加にもかかわらず, 増殖胆管には EGFP 陽性細胞を認めなかった。肝細胞と異なり, BMCs 注入は胆管細胞増殖に寄与する根拠は得られなかった。臨床的に胆管消失が難治性である一因もこの現象を支持するものと考えられた。一方(研究2)では注入羊膜細胞由来と考えられる胆管上皮細胞をごく少数であるが認め, この結果より羊膜細胞が胆管増殖に際して寄与しうる可能性が示唆された。したがって胆管消失症候群などに対する細胞移植療法において, 羊膜細胞が cell source となりうる可能性があり, 今後さらに至適条件などの詳細な検討が望まれる。

審 査 結 果 の 要 旨

肝内胆管消失は原発性胆汁性肝硬変のような難治性胆汁うっ滞性疾患において観察される。胆管細胞の低増殖性がある一因をなすと考えているが、その詳細は不明である。近年提唱されつつある幹細胞の概念は魅力ある治療概念であるが、骨髄細胞 (bone marrow cells (BMCs)) が胆管細胞に分化しうるかは不明である。そのため、研究1として胆汁うっ滞マウスモデルにおける BMC の胆管細胞への分化能を、研究2として、羊膜細胞の胆管上皮細胞への分化を検討した。結果として、研究1では、EGFP マウス由来の BMC 移植3週間には末梢血および骨髄に移植細胞の生着をみた。定量的 PCNA 染色により、ANIT 餌マウスでは著明な胆管増殖を認めた (2.0-4.2 倍 vs. コントロール)。この胆管増殖自体は照射の影響を受けなかった。しかし、移植後 1-5 週間までの観察期間で EGFP と CK7 両者共陽性の細胞は確認できなかった。このことをさらに EGFP の免疫染色にでも確認したが、やはり陽性細胞は存在しなかった。肝実質には散在性に EGFP 陽性細胞を認めたが、いずれの細胞も CK-7 もしくは c-Met との共陽性を示さなかった。ANIT 餌中止後増殖胆管は経時的に消失した。一連の経過観察期間中 Notch2 もしくは Hes1 蛋白発現は増殖胆管で認めなかった。

一方、研究2では、移植に供した羊膜細胞は免疫染色にて CK7 陰性、CD45 (Leukocyte Common Antigen) 陰性であった。羊膜細胞移植2週、4週後の肝組織にてコントロール群である ANIT 非投与群では CK7 免疫染色にて有意な胆管増殖を認めず、PCNA 染色でも胆管上皮細胞のごく一部のみ陽性であった。一方 ANIT 投与群 (胆汁うっ滞群) では CK7 免疫染色にて胆管増殖を認め、さらに PCNA 染色にて胆管上皮細胞の約 30% において陽性であった。一部の動物では管腔構造を形成する胆管細胞の一部に GFP, CK7 二重染色共陽性細胞を認めた。

以上より、ANIT 餌投与により顕著な胆管増殖を認めた。PCNA 陽性細胞の増加にもかかわらず、増殖胆管には EGFP 陽性細胞を認めなかった。BMC 移植は胆管細胞増殖に貢献する根拠は得られなかった。臨床的に胆管消失が難治性である一因もこの現象を支持するものと考えられた。一方実験 (2) で移植羊膜細胞由来と考えられる胆管上皮細胞をごく少数であるが認め、この結果より羊膜細胞が胆管増殖に際して寄与しうる可能性が示唆された。したがって胆管消失症候群などに対する細胞移植療法において、羊膜細胞が cell source となりうる可能性があり、今後さらに至適条件などの詳細な検討を続けていくことが必要と結論付けた。

第一次審査では、論文の記載法などにおいて改善の余地があるとコメントされたが、その点が今回の最終論文では適切に修正されており、また、修正された論文が英文誌に受領されたことより、肝疾患領域における細胞療法にとって本論文の意義は大きいと考えられる。

審査の結果、本論文内容が、東北大学の学位として十分に値することが確認された。

よって、本論文は博士 (医学) の学位論文として合格と認める。